



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 102 30 997 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:  
**A 61 K 31/711**

32

⑰ Aktenzeichen: 102 30 997.3  
⑳ Anmeldetag: 9. 7. 2002  
④③ Offenlegungstag: 17. 7. 2003

DE 102 30 997 A 1

③① Unionspriorität:  
PCT/EP02/00151 09. 01. 2002 EP  
PCT/EP02/00152 09. 01. 2002 EP  
  
⑦① Anmelder:  
Ribopharma AG, 95326 Kulmbach, DE  
  
⑦④ Vertreter:  
Dr. Gassner & Partner, 91052 Erlangen

⑦② Erfinder:  
Wajant, Harald, Dr., 70771 Leinfelden-Echterdingen,  
DE; Pfizenmaier, Klaus, Prof. Dr., 75233  
Tiefenbronn, DE; Vornlocher, Hans-Peter, Dr., 95448  
Bayreuth, DE; Limmer, Stefan, Priv. Doz. Dr., 95512  
Neudrossenfeld, DE; Kreutzer, Roland, Priv. Doz.  
Dr., 95466 Weidenberg, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤④ Medikament zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels
- ⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Medikament zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält.

DE 102 30 997 A 1

- [0001] Die Erfindung betrifft ein Medikament und eine Verwendung zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels. Die Erfindung betrifft weiterhin eine Verwendung zur Herstellung eines solchen Medikaments sowie ein Verfahren zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Wirkstoffs.
- [0002] Aus der DE 101 00 586 C1 ist ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle bekannt, bei dem ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle eingeführt wird. Ein Strang der doppelsträngigen Struktur ist dabei komplementär zum Zielgen.
- [0003] Ein bekannter Apoptose auslösender Wirkstoff ist der Tumor Nekrose Faktor-verwandte Apoptose auslösende Ligand TRAIL. TRAIL bewirkt durch Bindung an TRAIL-R1 und TRAIL-R2, zwei eine Todesdomäne enthaltende Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie, eine Aktivierung einer Caspase und löst dadurch Apoptose in Tumorzellen aus.
- [0004] Aus Yeh, W.-C. et al., Immunity 12 (2000), Seiten 633 bis 642 ist es bekannt, dass embryonale Fibroblasten aus der Maus, denen das zelluläre FLICE-Inhibitorprotein (c-FLIP) fehlt, besonders sensitiv gegenüber Rezeptor-vermittelter Apoptose sind. Bei diesen Zellen handelte es sich jedoch nicht um Tumorzellen.
- [0005] Es sind mehrere Spleiß-Varianten von c-FLIP bekannt, unter anderem eine kurze Spleiß-Variante c-FLIP-S und eine lange Spleiß-Variante c-FLIP-L.
- [0006] Aus Bin, L. et al., FEBS Lett 510 (1-2) (2002), Seiten 37 bis 40 ist es bekannt, dass c-FLIP-defiziente embryonalen Mausfibroblasten durch retroviral vermittelte Transduktion von c-FLIP-S resistent gegenüber TRAIL induzierter Apoptose werden.
- [0007] Tumorzellen sind häufig nicht oder kaum empfindlich gegenüber Apoptose auslösenden Arzneimitteln bzw. Wirkstoffen. Die Behandlung mit solchen Arzneimitteln erfordert daher häufig eine Co-Behandlung durch Bestrahlung oder Chemotherapie, um eine therapeutische Wirkung des Apoptose auslösenden Arzneimittels zu erreichen. Die genannten Co-Behandlungen gehen jedoch mit starken Nebenwirkungen einher.
- [0008] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Insbesondere soll ein Medikament und eine Verwendung zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels bereitgestellt werden, welches die oben genannten starken Nebenwirkungen vermeidet. Weiterhin soll eine Verwendung zur Herstellung eines solchen Medikaments und ein Verfahren zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Apoptose in Tumorzellen auslösenden Wirkstoffs bereitgestellt werden.
- [0009] Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 16, 17 und 33 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 15, 18 bis 32 und 34 bis 44.
- [0010] Erfindungsgemäß ist ein Medikament zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels vorgesehen, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält. Die Expression kann durch die dsRNA nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt werden. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem oder zwei Ribonukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nukleotide der dsRNA müssen kanonische Watson-Crick-Basenpaarungen aufweisen. Insbesondere einzelne nicht komplementäre Basenpaare beeinträchtigen die Wirksamkeit kaum oder gar nicht. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der dsRNA enthaltenen Strang.
- [0011] Das Medikament kann die dsRNA in einer zu der Hemmung der Expression des c-FLIP-Gens in den Tumorzellen ausreichenden Menge enthalten. Das Medikament kann auch so konzipiert sein, dass mehrere Einheiten des Medikaments zusammen die ausreichende Menge in der Summe enthalten. Die ausreichende Menge hängt von der Verabreichungsform ab. Zur Ermittlung einer ausreichenden Menge kann die dsRNA in steigenden Mengen bzw. Dosierungen verabreicht werden. Danach kann an einer aus dem Tumor entnommenen Gewebeprobe mit bekannten Methoden ermittelt werden, ob bei dieser Menge eine Hemmung der Expression des c-FLIP-Gens eingetreten ist. Bei den Methoden kann es sich z. B. um molekularbiologische, biochemische oder immunologische Methoden handeln.
- [0012] Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass die gezielte und ausschließliche Hemmung der Expression von c-FLIP durch RNA-Interferenz ausreichend ist, um Tumorzellen für eine Rezeptor-vermittelte Auslösung einer Apoptose empfänglich bzw. sensitiv zu machen. Das Medikament ermöglicht dadurch eine gezielte und nebenwirkungsarme bzw. nebenwirkungsschwache Behandlung von Tumoren mit spezifisch die Apoptose von Tumorzellen auslösenden Arzneimitteln.
- [0013] Vorzugsweise löst das Arzneimittel Apoptose mittels Tumor Nekrose Faktor oder Tumor Nekrose Faktor-verwandten Apoptose auslösenden Liganden, insbesondere TRAIL, aus. Die Wirksamkeit eines solchen Arzneimittels kann besonders effektiv durch das erfindungsgemäße Verfahren gesteigert werden.
- [0014] Vorzugsweise weist ein Strang S1 der dsRNA einen zum c-FLIP-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich auf. Unter dem "c-FLIP-Gen" wird der DNA-Strang der doppelsträngigen für c-FLIP kodierenden DNA in der Tumorzelle verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription als Matrize dienenden DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Bereiche ist. Bei dem c-FLIP-Gen handelt es sich also im allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression des c-FLIP-Gens gebildeten RNA-Transkript oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z. B. einer mRNA, sein. Es kann z. B. ausreichend sein, wenn der Strang S1 komplementär zu einem Teil des 3'-untranslatierten Bereichs der mRNA ist.
- [0015] Der komplementäre Bereich der dsRNA kann 19 bis 24, vorzugsweise 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweisen. Eine dsRNA mit dieser Struktur ist besonders effizient in der Inhibition des c-FLIP-Gens. Der Strang S1 der dsRNA kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweisen. Die Zahl dieser Nukleotide ist zugleich die Zahl der in der dsRNA maximal möglichen Basenpaare.
- [0016] Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Eine solche dsRNA weist gegenüber einer

dsRNA ohne einzelsträngige Überhänge an mindestens einem Ende eine bessere Wirksamkeit bei der Hemmung der Expression des c-FLIP-Gens auf. Ein Ende ist dabei ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus dem Strang S1 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dabei jeweils von einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden Strangende gebildet.

[0017] Vorzugsweise befindet sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1. Diese Lokalisation des einzelsträngigen Überhangs führt zu einer weiteren Steigerung der Effizienz des Medikaments. In einem Ausführungsbeispiel weist die dsEKA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang auf. Das andere Ende ist bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d. h. ohne Überhänge, ausgebildet. Eine solche dsRNA hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut und Serum als besonders beständig erwiesen.

[0018] Vorzugsweise weist die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 auf, d. h. sie ist aus zwei Einzelsträngen gebildet. Der Strang S1 oder der Strang S2 kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des c-FLIP-Gens komplementär sein. Vorzugsweise besteht die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll. Eine solche dsRNA ist in der Hemmung der Expression des c-FLIP-Gens besonders wirksam.

[0019] Die dsRNA kann in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid umschlossen vorliegen. Eine micellare Struktur, ein Virus-Kapsid oder ein Kapsoid kann die Aufnahme der dsRNA in die Tumorzellen erleichtern. Das Medikament kann eine Zubereitung aufweisen, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist. Eine zur Inhalation, Infusion oder Injektion geeignete Zubereitung kann im einfachsten Fall aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA bestehen. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass eine lediglich in einem solchen Puffer gelöste und verabreichte dsRNA von den Tumorzellen aufgenommen wird und die Expression des c-FLIP-Gens hemmt, ohne dass die dsRNA dazu in einem besonderen Vehikel verpackt sein muss.

[0020] Vorzugsweise ist die dsRNA pro vorgesehener Verabreichungseinheit in einer Menge enthalten, welche einer Dosierung von höchstens 5 mg pro kg Körpergewicht, insbesondere 200 µg pro kg Körpergewicht, entspricht. Es hat es sich nämlich gezeigt, dass die dsRNA bereits in dieser pro Tag verabreichten Dosierung eine ausgezeichnete Effektivität in der Hemmung der Expression des c-FLIP-Gens aufweist.

[0021] Erfindungsgemäß ist weiterhin die Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels vorgesehen. Weiterhin ist erfindungsgemäß die Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels vorgesehen.

[0022] Darüber hinaus ist ein Verfahren zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in einer Tumorzelle auslösenden Wirkstoffs vorgesehen, wobei eine zu einer Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Tumorzelle eingeführt wird. Unter "eingeführt werden" wird das Aufnehmen in die Zelle verstanden. Das Aufnehmen kann durch die Zelle selbst erfolgen. Es kann aber auch durch Hilfsstoffe oder Hilfsmittel vermittelt werden.

[0023] Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Verwendungen und des erfindungsgemäßen Verfahrens wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen. Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen beispielhaft erläutert. Es zeigt:

[0024] Fig. 1 den Einfluss einer Behandlung von SV80-Zellen mit die Expression des c-FLIP-Gens hemmender dsRNA auf die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose und

[0025] Fig. 2 den Einfluss einer Behandlung von KB-Zellen mit die Expression des c-FLIP-Gens hemmender dsRNA auf die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose.

[0026] KB-Zellen sind von der American Type Culture Collection (ATCC) unter der ATCC-Nr. CCL-17 zu beziehen. SV80-Zellen können von der Firma CLS, 69123 Heidelberg, Deutschland unter der Bestellnummer 0345 HU (ATCC-Nr.: CRL-7725) bezogen werden.

[0027] Die eingesetzten dsRNAs weisen folgende, im Sequenzprotokoll mit SEQ ID NO: 1 bis SEQ ID NO: 6 bezeichneten Sequenzen auf:

dsRNA-F1, welche den Nukleotiden 472 bis 492 des c-Flip-L-Gens entspricht:

S2: 5' -GUGCCGGGAUGUUGCUAUAGA-3' (SEQ ID NO: 1)

S1: 3' -AACACGGCCCUACAACGAUUAU-5' (SEQ ID NO: 2)

dsRNA-F2, welche den Nukleotiden 908 bis 928 des c-Flip-L-Gens entspricht:

S2: 5' -CAAGGAGCAGGGACAAGUUAC-3' (SEQ ID NO: 3)

S1: 3' -AAGUUCUCCUGUCCUGUUAUA-5' (SEQ ID NO: 4)

dsRNA-neo, welche zu einer Sequenz aus dem Neomycin-Resistenz-Gen komplementär ist:

S2: 5'-GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA-3' (SEQ ID NO: 5)

S1: 3'-UCCUACUCCUAGCAAAGCGUA-5' (SEQ ID NO: 6)

5 [0028] Jeweils  $10^7$  SV80- und KB-Zellen pro ml sind mittels Elektroporation transient zweimal an aufeinanderfolgenden Tagen ohne (Fig. 1A, Fig. 2A) oder mit 150 nmol/l dsRNA-neo (Fig. 1B, Fig. 2B), 150 nmol/l dsRNA-F1 (Fig. 1C, Fig. 2C), 150 nmol/l dsRNA-F2 (Fig. 1D, Fig. 2D) oder einem Gemisch von jeweils 75 nmol/l dsRNA-F1 und dsRNA-F2 (Fig. 1E, Fig. 2E) transfiziert worden. Bei der jeweils ersten Elektroporation ist der Elektroporationslösung ein GFP (green fluorescent protein)-Expressionsplasmid zugesetzt worden, um die jeweilige Effizienz der Transfektion überprüfen zu können. Einen Tag nach der ersten Elektroporation sind die Zellen geerntet worden. Mit einem Teil der Zellen ist die Transfektionseffizienz mittels Messung der Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt worden. Die Fluoreszenzintensität dieser Zellen ist in den Fig. 1A-E und 2A-E jeweils im linken Feld durch eine durchgezogene dicke Linie dargestellt. Die im jeweils gleichen Feld durch eine dünne Linie dargestellte Fluoreszenzintensität ist diejenige der jeweils gleichen Zellen ohne ein GFP-Expressionsplasmid. Um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, ist der andere Teil der Zellen ein zweites mal jeweils mit derselben dsRNA wie am ersten Tag elektroporiert worden. Danach sind die Zellen in jeweils 100 µl Medium in die Vertiefungen von 96-Well-Platten ausgesät worden. Am nächsten Tag sind die Zellen für jeweils 9 h inkubiert worden mit

20 - Flag-gekoppeltem löslichem und mit dem monoklonalen anti Flag-Antikörper M2 quervernetzten TRAIL ("TRAIL"), welches sowohl TRAIL-R1 als auch TRAIL-R2 stimulieren kann,  
 - agonistischem für TRAIL-R1 ("αTR1") und/oder TRAIL-R2 ("αTR2") spezifischem Kaninchen-Antiserum (1 : 500) oder  
 - Flag-gekoppeltem löslichem, wie oben angegeben quervernetztem TRAIL in Gegenwart von 20 µmol/l des Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk ("TRAIL + ZVAD").

25 [0029] Schließlich wurde der Anteil vitaler Zellen mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt.

[0030] Aus den in den Fig. 1 und 2 dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Transfektionseffizienz des GFP-Expressionsplasmids in keiner der untersuchten Zelllinien durch die dsRNA beeinflusst worden ist. dsRNA-F1 und dsRNA-F2 (Fig. 1C-E, Fig. 2C-E), nicht aber dsRNA-neo (Fig. 1B, Fig. 2B) oder Elektroporation ohne dsRNA (Kock-Elektroporation) (Fig. 1A, Fig. 2A) haben KB- und SV80-Zellen signifikant für eine TRAIL-R1 und eine TRAIL-R2 vermittelte Apoptose sensibilisiert. ZVAD hat die Sensibilisierung für die TRAIL-induzierte Apoptose wieder aufgehoben. Das deutet auf die Beteiligung von Caspasen hin (Fig. 1C-E, Fig. 2C-E).

[0031] In einem weiteren nicht dargestellten Experiment sind KB-Zellen durch die Behandlung mit dsRNA-F1 und dsRNA-F2 auch für eine FasL- und TNF-induzierte Apoptose sensibilisiert worden.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Ribopharma AG		
<120> Medikament zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels		5
<130> 422272EH		
<140>		10
<141>		
<160> 6		
<170> PatentIn Ver. 2.1		15
<210> 1		
<211> 21		
<212> RNA		20
<213> Homo sapiens		
<400> 1		
gugccgggau guugcuauag a	21	25
<210> 2		
<211> 21		
<212> RNA		
<213> Homo sapiens		30
<400> 2		
uauagcaaca ucccggcaca a	21	
<210> 3		35
<211> 21		
<212> RNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 3		40
caaggagcag ggacaaguua c	21	
<210> 4		45
<211> 21		
<212> RNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 4		
aacuuguccc ugcuccuuga a	21	50
<210> 5		
<211> 21		55
<212> RNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang einer zu einer Sequenz des Neomycin-Resistenzgens		60
		65

## komplementären dsRNA

&lt;400&gt; 5

gaugaggau c guuucgcaug a

21

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des

Neomycin-Resistenzgens komplementären dsRNA

&lt;400&gt; 6

augcgaaacg auccucaucc u

21

## Patentansprüche

1. Medikament zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptorvermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält.

2. Medikament nach Anspruch 1, wobei das Arzneimittel Apoptose mittels Tumor Nekrose Faktor oder Tumor Nekrose Faktor-verwandten Apoptose auslösenden Liganden, insbesondere TRAIL, auslöst.

3. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum c-FLIP-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.

4. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweist.

5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweist.

6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.

7. Medikament nach Anspruch 8, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

8. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.

9. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.

10. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 oder der Strang S2 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des c-FLIP-Gens komplementär ist.

11. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.

12. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsid umschlossen vorliegt.

13. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

14. Medikament nach Anspruch 15, wobei die Zubereitung aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.

15. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA pro vorgesehener Verabreichungseinheit in einer Menge enthalten ist, welche einer Dosierung von höchstens 5 mg pro kg Körpergewicht, insbesondere 200 µg pro kg Körpergewicht, entspricht.

16. Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels.

17. Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels.

18. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17, wobei das Arzneimittel Apoptose mittels Tumor Nekrose Faktor oder Tumor Nekrose Faktor-verwandten Apoptose auslösenden Liganden, insbesondere TRAIL, auslöst.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum c-FLIP-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweist.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweist.
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. 5
23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
24. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 23, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
25. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 24, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist. 10
26. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 25, wobei der Strang S1 oder der Strang S2 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des c-FLIP-Gens komplementär ist.
27. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 26, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 15 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.
28. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 27, wobei die dsRNA zur Applikation in einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid umschlossen vorliegt.
29. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 28, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist. 20
30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei die Zubereitung aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.
31. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 30, wobei die dsRNA oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, verabreicht wird. 25
32. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 31, wobei die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg pro kg Körpergewicht pro Tag, insbesondere 200 µg pro kg Körpergewicht pro Tag, einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.
33. Verfahren zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptorvermittelt Apoptose in einer Tumorzelle auslösenden Wirkstoffs, wobei eine zu einer Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Tumorzelle eingeführt wird. 30
34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei der Wirkstoff Tumor Nekrose Faktor oder Tumor Nekrose Faktor-verwandte Apoptose auslösende Liganden, insbesondere TRAIL, umfasst.
35. Verfahren nach Anspruch 33 oder 34, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum c-FLIP-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist. 35
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweist.
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 36, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweist. 40
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 37, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
40. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 39, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist. 45
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 40, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.
42. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 41, wobei der Strang S1 oder der Strang S2 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des c-FLIP-Gens komplementär ist. 50
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 42, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.
44. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 43, wobei die dsRNA in einer Lösung oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid umschlossen vorliegt. 55

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

---

60

65

- Leerseite -



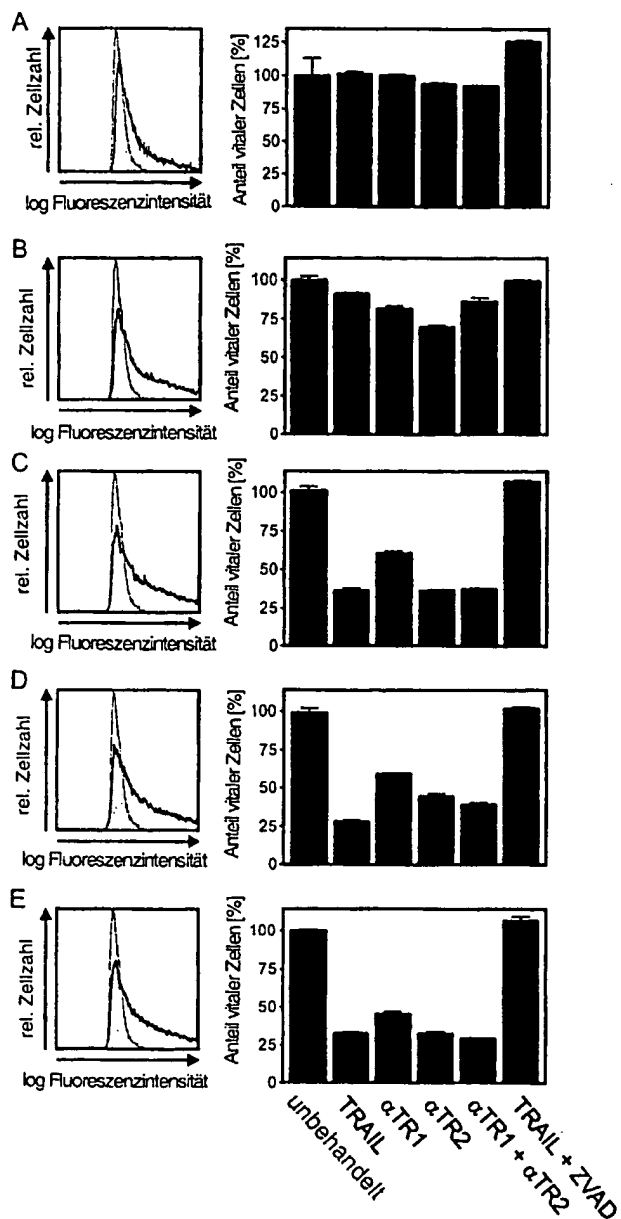


Fig. 1

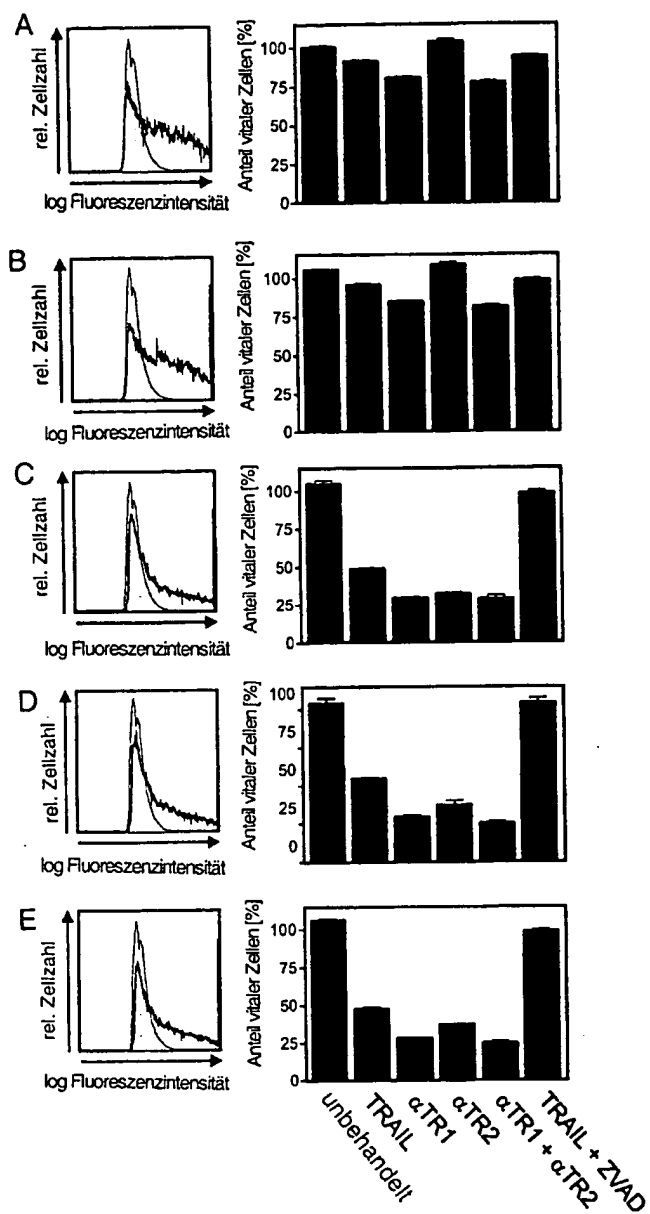


Fig. 2